

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 02-227095

(43)Date of publication of application : 10.09.1990

(51)Int.Cl.

C12P 21/08
// A61K 39/395
C12N 5/20
C12N 15/06
G01N 33/53
G01N 33/577
(C12P 21/08
C12R 1:91)

(21)Application number : 01-274340

(71)Applicant : OTSUKA PHARMACEUT CO LTD

(22)Date of filing : 20.10.1989

(72)Inventor : OMOTO YASUKAZU

NISHIDA TSUTOMU

MIZUNO KEIKO

NAKAI SATORU

(30)Priority

Priority number : 63267897 Priority date : 24.10.1988 Priority country : JP

(54) MONOCLONAL ANTIBODY

(57)Abstract:

PURPOSE: To provide a new immunoassay capable of easily determining human TNF- α in high sensitivity and precision by using a monoclonal antibody having a specific reactivity to human TNF- α .

CONSTITUTION: A plasma cell (immunocyte) of a mammal (e.g. mouse) immunized by using human tumor necrosis factor (abbreviated as TNF) TNF- α as an immunogen is cultured together with a blastoma cell of a mammal (e.g. P3) in a medium such as RPMI-1640 to obtain a fused cell. A clone capable of producing the objective antibody is selected from the fused cell and is cultured to produce a monoclonal antibody. The antibody can be further purified by salting-out, gel-filtration, etc., to obtain a pure product having specific reactivity to TNF- α . The antibody provides an immunoassay process having extremely high sensitivity and excellent specificity and, accordingly, an extremely low concentration of human TNF- α such as the concentration in a clinical sample can be accurately determined by the use of the antibody.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Registration]

[Appeal against examiner's decision]

[Requesting appeal against examiner's rejection]

AN7

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2000 Japan Patent Office

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

平2-227095

⑬ Int. Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成2年(1990)9月10日

C 12 P 21/08

8214-4B※

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全7頁)

⑮ 発明の名称 モノクローナル抗体

⑯ 特 願 平1-274340

⑰ 出 願 平1(1989)10月20日

優先権主張 ⑱ 昭63(1988)10月24日 ⑲ 日本(JP) ⑳ 特願 昭63-267897

㉑ 発 明 者 大 本 安 一 徳島県板野郡松茂町笹木野字八下35-2

㉒ 発 明 者 西 田 勉 徳島県鳴門市大津町大代240番地の118

㉓ 発 明 者 水 野 啓 子 徳島県徳島市中昭和町2丁目39-1 ローレルハイツ中村302

㉔ 発 明 者 中 井 哲 徳島県板野郡松茂町広島字南川向67-4

㉕ 出 願 人 大塚製薬株式会社 東京都千代田区神田司町2丁目9番地

㉖ 代 理 人 弁理士 三枝 英二 外2名

最終頁に続く

明 細 書

発明の名称 モノクローナル抗体

特許請求の範囲

① ヒトTNF- α に特異反応性を有することを特徴とするモノクローナル抗体。

発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明は、ヒトの腫瘍壊死因子(TNF; tumor necrosis factor)に対する抗体、より詳しくは医薬として有用な上記ヒトTNFの免疫学的精製、測定等を可能とする該ヒトTNFに対する抗体に関する。

従 来 の 技 術

バチルス カルメッティ グェリン(Bacillus de Calmette Guerin, BCG)で感作したマウス、ウサギ、ラットにリポポリサッカライド(LPS)を投与すると、血清中に腫瘍を出血性壊死させる因子が誘起される。1975年にカースウェル

(Carswell)らは、この因子をTNFと名付けた[Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 72, p 3666 (1975)]。BCGで感作したマウスの脾臓では、マクロファージの増生が見られ、LPSの投与によれば、その崩壊が起こることから、従来上記TNFはマクロファージにより産生されと考えられていた。最近になって、単離したマクロファージを// 11110でLPS処理すると、その培養上清中にTNF活性が誘起されることが明らかにされ、マクロファージがTNFの産生細胞であることが確認された。また現在TNFを産生する白血病細胞が幾つか報告されている。

しかして、TNFは各種がん細胞に致死あるいは増殖抑制効果を示すが、正常細胞には之等の効果を示さないことから、がんの治療への応用の期待が高まってきており、実際にマウスあるいはウサギ由来の精製TNFを用いたがん実験の結果から、TNFの抗腫瘍効果が認められている。

TNFの活性はこれに対して強い感受性を示す。マウス由来の繊維芽細胞 L929を用いて測定されてきており、培養プレートに増殖させた上記 L929細胞を50%崩壊致死させる濃度を1単位として、その力価を表すのが一般的である。

各種動物の産生するTNFの分子量は、ゲル濾過分析で、例えばマウスでは15万と4万～6万の2種類、ウサギでは67000と39000の2種類、ヒトでは34000～140000と報告されている。SDS-PAGEによる分子量分析では、ヒト及びウサギの精製TNFは、分子量17000と報告され、現在この分子量のTNFが「TNF- α 」と呼ばれており、天然のTNFは多量体として存在すると考えられている。

1984年に、TNF産生細胞であるヒト前骨髄球系白血病細胞株「HL-60」を用いて、TNFのcDNAのクローニングが成功をおさめ、該TNFの大腸菌での大量生産が可能となった。

すると推測されている。

TNFは、上述したようにその特有の生理活性より医薬品としての応用が期待でき、種々研究が成されていると共に、各種免疫欠損病や異常免疫応答の研究、之等の臨床サンプルにおけるその測定等の面においても種々研究が重ねられている。

しかるに、現在上記TNF- α の測定技術としては、バイオアッセイ（生物学的検定法）が知られており、この方法ではTNFは被検サンプルの活性量として測定されているが、この方法は操作性や精度の面で劣っており、また常に測定値を干渉する成分の存在を考慮する必要がある。従って、上記方法に代る新しいTNFの測定技術の開発が新界で切望されている。

発明が解決しようとする課題

本発明は、上記ヒトTNF- α の新しい免疫学的測定技術、該技術に利用できるTNF- α に対する抗体を提供することをその目的とする。

またこのDNAクローニングの結果、ヒトのTNFは157個のアミノ酸より構成され、非常に長い76個のアミノ酸よりなるポリペプチドを前駆配列として持つことが明らかにされた[D. Passica et al., *Nature*, 312, 724～729 (1984)]。ほぼ同時に、染色体上の遺伝子のクローニングも報告され[T. Shirai et al., *Nature*, 313, 803 (1985)]、ヒトのTNF遺伝子は4つのエクソンより構成されていることが明らかにされた。

TNFのアミノ酸配列及び遺伝子の塩基配列は、B細胞が産生する細胞障害性因子及びリンホトキシン(LT)とそれぞれ28%及び46%の相同性がある。但しTNFはN-グリコシル型の糖鎖の結合部位がない点で上記LTとは本質的に異なる。また、TNFとLTとは免疫学的交叉反応性を有しないが、非常に類似した細胞障害性を示すことから、両者の相同部分が該細胞障害性に関与

課題を解決するための手段

本発明によれば、TNF- α に対して特異反応性を有するモノクローナル抗体が提供される。

本発明モノクローナル抗体の利用によれば、上記ヒトTNF- α を高感度、高精度でしかも簡便に測定できる新しい免疫検定法（イムノアッセイ法）が提供される。

また本発明抗体はTNF- α に特異的であるため、その利用によれば例えばアフィニティークロマトグラフィー等の手法によるそれらの特異的精製手段も提供できる。

以下、本発明抗体の製法につき詳述する。

本発明抗体は、TNF- α を免疫抗原として利用して製造することができる。より具体的には、例えば上記免疫抗原で免疫した哺乳動物の形質細胞（免疫細胞）と哺乳動物の形質細胞腫細胞との融合細胞（ハイブリドーマ、hybridoma）を作成し、これより所望抗体を産生するクローンを選択

し、該クローンの培養により製造、採取することができる。

上記方法において用いられる免疫抗原としてのTNF- α としては、特に限定はなく、既に公知のインビトロで誘導されたヒトTNFを含有する培養上清乃至その精製標品〔Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 82, 6637 (1985)〕、遺伝子組換え技術に従い製造されたヒトTNF〔Nature, 312, 724~729 (1984)〕及びそれらの一部のアミノ酸配列を有する合成ペプチド等のいずれでもよい。

また、上記方法において免疫抗原で免疫される哺乳動物としては、特に制限はないが、細胞融合に使用する形質細胞腫細胞との適合性を考慮して選択するのが好ましく、一般にはマウス、ラット等が有利に用いられる。

免疫は一般的方法により、例えば上記免疫抗原を哺乳動物に静脈内、皮内、皮下、腹腔内注射等

35, 1-21 (1980)〕、 $\times 63$, 6, 5, 3, 〔J. Immunol., 123, 1548-1550 (1979)〕、S194〔J. Exp. Med., 148, 313-323 (1978)〕等や、ラットにおけるR210〔Nature, 277, 131-133 (1979)〕等の骨髄腫細胞等を使用できる。

上記免疫細胞と形質細胞腫細胞との融合反応は、公知の方法、例えばマイルスタイン (Milstein) らの方法〔Methods in Enzymology, Vol. 73, pp3 (1981)〕等に準じて行なうことができる。より具体的には、上記融合反応は、通常の融合促進剤、例えばポリエチレングリコール

(PEG)、センダイウイルス (HVJ) 等の存在下に、通常の培地中で実施され、培地には更に融合効率を高めるためにジメチルスルホキシド等の補助剤を必要に応じて添加することもある。免疫細胞と形質細胞腫細胞との使用比は、通常の

により投与することにより実施できる。より具体的には、免疫抗原を、所望により通常のアジュバントと併用して、供試動物に3~5日毎に数回投与し、総投与量が約100~500 μ g/マウス程度になるようにするのが好ましい。免疫抗原としては、上記最終投与の約3日後に摘出した脾臓細胞を使用するのが好ましい。

更に、上記免疫細胞と融合される他方の親細胞としての哺乳動物の形質細胞腫細胞としては、既に公知の種々のもの、例えばp3 (p3/ $\times 63$ -Ag8)〔Nature, 256, 495-497 (1975)〕、p3-U1〔Current Topics in Microbiology and Immunology, 81, 1-7 (1978)〕、NS-1〔Eur. J. Immunol., 6, 511-519 (1976)〕、MPC-11〔Cell, 8, 405-415 (1976)〕、SP2/0〔Nature, 276, 269-270 (1978)〕、FO〔J. Immunol. Meth.,

方法と変りはなく、例えば形質細胞腫細胞に対して免疫細胞を約1~10倍程度用いるのが普通である。融合反応時の培地としては、形質細胞腫細胞の増殖に通常使用される各種のもの、例えばRPMI-1640培地、MEM培地、その他のこの種細胞培養に一般に利用されるものを例示でき、通常之等培地は牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液を抜いておくのがよい。融合は上記免疫細胞と形質細胞腫細胞との所定量を、上記培地内でよく混合し、予め37℃程度に加温したPEG溶液、例えば平均分子量1000~8000程度のものを、通常培地に約30~60v/v%の濃度で加えて混ぜ合わせるにより行なわれる。以後、適当な培地を逐次添加して遠心し、上清を除去する操作を繰返すことにより所望のハイブリドーマが形成される。

得られる所望のハイブリドーマの分離は、通常の選別用培地、例えばHAT培地 (ヒポキサンチ

ン、アミノプテリン及びチミジンを含む培地)で培養することにより行なわれる。該HAT培地での培養は、目的とするハイブリドーマ以外の細胞(未融合細胞等)が死滅するのに十分な時間、通常数日〜数週間行なえばよい。かくして得られるハイブリドーマは、通常の限界希釈法により目的とする抗体の検索及び単一クローン化に供される。

目的抗体産生株の検索は、例えばELISA法(Engvall, E., Meth. Enzymol., 70, 419-439(1980))、ブランク法、スポット法、凝集反応法、オクテロニー(Ouchterlony)法、ラジオイムノアッセイ(RIA)法等の一般に抗体の検出に用いられている種々の方法[「ハイブリドーマ法とモノクローナル抗体」、株式会社R&Dプランニング発行、第30-53頁、昭和57年3月5日]に従い実施することができ、この検索には前記免疫抗原が利用できる。

かくして得られるヒトTNF- α を認識する所

の特異的測定に好適である。更に本発明抗体中にはTNF- α 分子の異なる部位を認識し、抗体相互の立体障害がなく、同時にTNF- α 分子に結合できるタイプの抗体も包含され、かかる抗体は例えばサンドイッチ法等による免疫検体に有効である。更に加えて、本発明抗体中には液相系又は固相系での反応性が特に優れたタイプの抗体が包含され、それらは液相系及び固相系免疫検定法に適用するのに適している。

発 明 の 効 果

本発明によれば、ヒトTNF- α に特異的なモノクローナル抗体が提供され、この本発明抗体の利用によれば、測定感度が極めて高く、特異性に優れ、従って、例えば臨床サンプル等の極めて低濃度のヒトTNF- α を含有する検体中の、該TNF- α を、正確に測定可能な免疫検定法による測定手法が提供される。

実 施 例

望のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、通常の培地で継代培養することができ、また液体培養中で長期間保存することができる。

上記ハイブリドーマからの所望抗体の採取は、該ハイブリドーマを、常法に従って培養してその培養上清として得る方法やハイブリドーマをこれと適合性のある哺乳動物に投与して増殖させ、その腹水として得る方法等が採用される。前者の方法は、高純度の抗体を得るのに適しており、後者の方法は、抗体の大量生産に適している。

また上記のごとくして得られる抗体は、更に塩析、ゲル透過法、アフィニティクロマトグラフィー等の通常的手段により精製することができる。

かくして得られる本発明のモノクローナル抗体は、TNF- α に特異反応性を有する。

また本発明抗体中には、ヒトTNF- α の生物活性に対して中和活性を有するタイプの抗体が包含され、かかる抗体は生物活性のあるTNF- α

以下、本発明をより詳しく説明するため実施例を挙げるが、本発明は之等に限定されない。

実施例 1

本発明抗体の製造

遺伝子組換え技術に従い製造したヒトTNF- α ([Nature, 312, 724~729 (1984)) の10~20 μ gを、BALB/cマウスに、完全フロイドアジュバントと共に腹腔内投与した。3~4週間おきに、同量を不完全アジュバントと共に2回追加投与して免疫した。最終免疫の3~4日後に、常法に準じて、細胞融合を行なった (Method in Enzymology, 73, pp 3 (1981) 等参照)。即ち、該細胞融合は、上記免疫された脾細胞と骨髓腫細胞 (P3U1, Current Topics in Microbiology and Immunology, 81, 1-7 (1978)) とを10:1の割合で用い、ポリエチレングリコール (PEG-4000) を用いて行なった。

ハイブリドーマを、HAT培地で選別後、その上清を上記ヒトTNF- α をコートした96穴マイクロプレート及びパーオキシダーゼ標識ヤギ抗マウスグロブリン抗体（イー・ワイ・ラブ（E. Y. Lab.）社製）を用いた酵素免疫測定法により試験して、目的のヒトTNF- α に対する抗体産生株を検出した。

限界希釈法によりクローニングを繰返して、所望の抗体産生クローン7株を得た。之等をそれぞれ「KOCO701」～「KOCO707」と命名し、之等から得られる本発明抗体をそれぞれ「ANOC701」～「ANOC707」と命名する。

本出願人はそのうちの一株（本発明抗体産生ハイブリドーマKOCO705）を、通産省工業技術院微生物工業技術研究所（微工研）に、「KOCO705」なる表示で、微工研発寄第2-569号（FERM BP-2569）として寄託した。

いて精製し、その濃度（mg/ml）をOD₂₈₀の吸光度測定により求めた。但しIgG1 mg/mlのとき、OD₂₈₀ = 1.4とした。

結果を下記第2表に示す。

第 2 表

抗体No.	IgG (mg/ml)
ANOC701	0.1
ANOC702	1.6
ANOC703	0.2
ANOC704	1.2
ANOC705	1.1
ANOC706	8.6
ANOC707	2.0

③ 中和抗体力価

TNFのバイオアッセイの一つであるLMアッセイを用いて腹水の中和抗体力価を求めた。該中和抗体力価は腹水1mlがTNF- α の何単位を1

上記各クローンから得られた本発明抗体の特性を以下に示す。

① 抗体のサブクラス

マウス抗体サブクラス検出キット（バイオ・ラッド（Bio-Rad）社製）を用いて決定した。

結果は下記第1表の通りである。

第 1 表

抗体No.	サブクラス
ANOC701	IgG ₁
ANOC702	IgG ₁
ANOC703	IgG _{2b}
ANOC704	IgG ₁
ANOC705	IgG ₁
ANOC706	IgG ₁
ANOC707	IgG ₁

② 抗体産生レベル

腹水中のIgGをProtein Aアフィニティを用

単位まで中和できるかで決定された。

結果を下記第3表に示す。

第 3 表

抗体No.	中和抗体力価 (U)
ANOC701	32000<
ANOC702	32000<
ANOC703	2000>
ANOC704	32000<
ANOC705	32000<
ANOC706	32000<
ANOC707	32000<

④ 分子量

ハイブリドーマをマウスの腹腔内で培養した後、IgG精製キット（MOPS Kit、バイオ・ラッド社製）により、IgG₁に精製したものを、2ME存在下SDS-PAGEにより電気泳動させて、重鎖と軽鎖の分子量を求め、その和を抗体

の分子量とした。

結果を下記第4表に示す。

第 4 表

抗体No.	分 子 量 (k d)		
	重 鎖	軽 鎖	I g G
ANOC701	N. T.	N. T.	N. T.
ANOC702	53.0	25.0	156
ANOC703	53.0	24.5	155
ANOC704	52.0	24.0	152
ANOC705	53.0	24.5	155
ANOC706	53.0	23.0	152
ANOC707	50.0	24.8	148

⑤ ウェスタンブロッティング分析

本発明抗体につき、特異的にTNF- α と結合し、大腸菌と反応しないことを以下の方法により確かめた。即ち、rTNF- α とこれを産生している大腸菌をSDSのlysis bufferで最終濃度が

TNF- α と結合し、大腸菌の蛋白質とは反応しないことが判る。またANOC703はウェスタンブロッティングでrTNF- α と反応しないことから立体構造を認識している可能性がある。

⑥ ELISA感度

モノクローナル抗体 (ANOC701~707) を、96穴マイクロプレートに10 μ g/ μ lにPBSで希釈して100 μ lずつ分注し、4℃で一夜放置した。1%スキムミルクでブロッキングした後、TNF- α の標準品を各ウェルに100 μ lずつ分注して4℃で一夜反応させた。プレートを洗浄後、TNF- α に対する兔のポリクローナル抗体 (OCT701) 1000倍希釈液を各ウェルに100 μ lずつ分注して、室温で2時間反応させた。プレートを洗浄後、POD標識ウサギIgGヤギ抗体を各ウェルに100 μ lずつ分注して、室温で2時間反応させた。プレートを洗浄後、PODの酵素活性を測定した。

100 μ g/ μ lになるように処理した。続いて、SDS-PAGEを行ない、ニトロセルロースにブロッティングして、各モノクローナル抗体との反応性を調べた。

結果を下記第5表に示す。

第 5 表

抗体No.	反 応 性	
	大腸菌蛋白質	TNF- α
ANOC701	-	++
ANOC702	-	++++
ANOC703	-	-
ANOC704	-	++++
ANOC705	-	++
ANOC706	-	++
ANOC707	-	++

上記第5表より、ANOC701、702、704、705、706及び707は、特異的に

TNF- α の0濃度とOD₄₉₂の吸光度の差が0.1になるTNF- α の濃度をELISA感度とした。

結果を下記第6表に示す。

第 6 表

抗体No.	ELISA 感度 (Δ OD ₄₉₂ = 0.1)
ANOC701	N. T.
ANOC702	1.0ng/ μ l (0.10 ng/ウェル)
ANOC703	N. T.
ANOC704	1.2ng/ μ l (0.12 ng/ウェル)
ANOC705	0.44ng/ μ l (0.044ng/ウェル)
ANOC706	0.88ng/ μ l (0.088ng/ウェル)
ANOC707	1.0ng/ μ l (0.10 ng/ウェル)

⑦ ELISA法による標準曲線

モノクローナル抗体 (ANOC705) を、96穴マイクロプレートに10 μ g/ μ lにPBSで希釈して100 μ lずつ分注し、4℃で一夜放

置した。1%スキムミルクでブロッキングした後、
TNF- α の標準品を各濃度に希釈し、各ウェル
に100 μ lずつトリプレイトに分注して4℃
で一晩反応させた。プレートを洗浄後TNF- α
に対する兔のポリクローナル抗体(OCT701)
1000倍希釈液を各ウェルに100 μ lずつ分
注して、室温で2時間反応させた。プレートを洗
浄後、POD標識ウサギIgGヤギ抗体を各ウェ
ルに100 μ lずつ分注して、室温で2時間反応
させた。プレートを洗浄後、結合したPODの酵
素活性をo-フェニレンジアミンを基質として
OD₄₉₂の吸光度測定により求めた。

結果を下記第7表に示す。

第 7 表

TNF- α 濃度 (μ g/ml)	0	9.375	37.50	150.0	600.0
(トリプレイト)					
吸光度-1	89	117	205	535	1501
吸光度-2	95	123	206	540	1481
吸光度-3	95	124	209	514	1487
Mean	93	121	207	530	1490
Mean-Blank	0	28	114	437	1397
C. V. (%)	3.7	3.1	1.0	2.6	0.7

(以 上)

代理人 弁理士 三 枝 英 二



第1頁の続き

④Int. Cl.⁹

// A 61 K 39/395
C 12 N 5/20
G 01 N 15/06
33/53
(C 12 P 33/577
C 12 R 21/08
1:91)

識別記号

庁内整理番号

N 8829-4C

P 7906-2G

B 7906-2G